

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

IN RE APPLICATION OF: Susumu HIROSE, et al.

GAU:

SERIAL NO: New Application

EXAMINER:

FILED: Herewith

FOR: METHOD FOR DETECTING NEGATIVELY SUPERCOILED DNA

REQUEST FOR PRIORITY

COMMISSIONER FOR PATENTS
ALEXANDRIA, VIRGINIA 22313

SIR:

- Full benefit of the filing date of U.S. Application Serial Number , filed , is claimed pursuant to the provisions of 35 U.S.C. §120.
- Full benefit of the filing date(s) of U.S. Provisional Application(s) is claimed pursuant to the provisions of 35 U.S.C. §119(e): Application No. Date Filed
- Applicants claim any right to priority from any earlier filed applications to which they may be entitled pursuant to the provisions of 35 U.S.C. §119, as noted below.

In the matter of the above-identified application for patent, notice is hereby given that the applicants claim as priority:

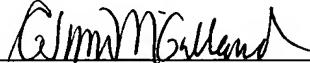
<u>COUNTRY</u>	<u>APPLICATION NUMBER</u>	<u>MONTH/DAY/YEAR</u>
Japan	2003-146059	May 23, 2003

Certified copies of the corresponding Convention Application(s)

- are submitted herewith
- will be submitted prior to payment of the Final Fee
- were filed in prior application Serial No. filed
- were submitted to the International Bureau in PCT Application Number
Receipt of the certified copies by the International Bureau in a timely manner under PCT Rule 17.1(a) has been acknowledged as evidenced by the attached PCT/IB/304.
- (A) Application Serial No.(s) were filed in prior application Serial No. filed ; and
- (B) Application Serial No.(s)
 are submitted herewith
 will be submitted prior to payment of the Final Fee

Respectfully Submitted,

OBLON, SPIVAK, McCLELLAND,
MAIER & NEUSTADT, P.C.



Norman F. Oblon

Registration No. 24,618

C. Irvin McClelland
Registration Number 21,124

Customer Number

22850

Tel. (703) 413-3000
Fax. (703) 413-2220
(OSMMN 05/03)

JCT0013 US

日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日 Date of Application: 2003年 5月23日

出願番号 Application Number: 特願2003-146059

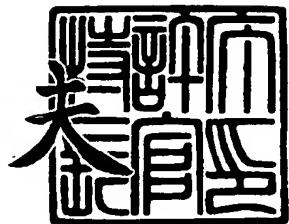
[ST. 10/C]: [JP2003-146059]

出願人 Applicant(s): 国立遺伝学研究所長

2003年10月 8日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今井康



出証番号 出証特2003-3083132

【書類名】 特許願

【整理番号】 P02011505

【特記事項】 特許法第30条第1項の規定の適用を受けようとする特許出願

【あて先】 特許庁長官 殿

【発明者】

【住所又は居所】 静岡県三島市谷田夏梅木 1982-55

【氏名】 広瀬 進

【発明者】

【住所又は居所】 静岡県三島市柳郷地 77-5 ハイツ山田B 202

【氏名】 松本 国治

【特許出願人】

【識別番号】 593206872

【氏名又は名称】 国立遺伝学研究所長

【代理人】

【識別番号】 110000084

【氏名又は名称】 特許業務法人アルガ特許事務所

【代表者】 中嶋 俊夫

【選任した代理人】

【識別番号】 100068700

【弁理士】

【氏名又は名称】 有賀 三幸

【選任した代理人】

【識別番号】 100077562

【弁理士】

【氏名又は名称】 高野 登志雄



【選任した代理人】

【識別番号】 100096736

【弁理士】

【氏名又は名称】 中嶋 俊夫

【選任した代理人】

【識別番号】 100089048

【弁理士】

【氏名又は名称】 浅野 康隆

【選任した代理人】

【識別番号】 100101317

【弁理士】

【氏名又は名称】 的場 ひろみ

【選任した代理人】

【識別番号】 100117156

【弁理士】

【氏名又は名称】 村田 正樹

【選任した代理人】

【識別番号】 100111028

【弁理士】

【氏名又は名称】 山本 博人

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 負の超らせんDNAの検出法

【特許請求の範囲】

【請求項1】 ビオチン化ソラレン類を細胞に導入し、当該細胞に長波長紫外線を照射した後、発色性、蛍光性又は化学発光性の標識アビジン類を反応させ、次いで当該細胞の発色、蛍光又は発光を測定することを特徴とする細胞内の負の超らせんDNAの検出法。

【請求項2】 ビオチン化ソラレン類を細胞に導入し、当該細胞に長波長紫外線を照射した後、発色性、蛍光性又は化学発光性の標識アビジン類を反応させ、次いで当該細胞の発色、蛍光又は発光を測定することを特徴とする負の超らせんDNA含有細胞の検出法。

【請求項3】 細胞が、真核生物細胞である請求項1又は2記載の検出法。

【請求項4】 ビオチン化ソラレン類の細胞への導入が、細胞膜透過性促進剤の存在下にビオチン化ソラレン類を細胞に導入するものである請求項1～3のいずれか1項記載の検出法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、細胞からDNAを抽出することなしに、細胞内の負の超らせんDNAを簡便かつ効率よく検出する方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

DNAは平均10.5塩基対毎に一回転する2重らせん構造をしているが、DNAの末端を拘束した状態で、らせんのピッチをきつくする、あるいは緩める方に回転させると超らせんを生じ、それぞれ正および負の超らせん構造という。当該DNAの超らせん構造は、転写や複製に重要な役割を担っていると考えられている。特に真核生物における負の超らせんDNAは、転写が活発に起こっている細胞に多く蓄積され、がん細胞などの転写活性の高い細胞で多く存在することが指摘されている。従って、超らせんDNAの検出は、がんの検出等の転写活性の

高いDNAの検出に有用であると考えられている。

【0003】

このような超らせんDNAの検出法としては、ソラレンが負の超らせんDNAに選択的に結合する性質を利用した方法が採用されている。すなわち、細胞にソラレンを取り込ませ、長波長紫外線照射によりDNAに固定化後、DNAを抽出して制限酵素で切断し、ソラレンが結合したDNAを非結合DNAから電気泳動を用いて分離し、メンブランに移した後、サザンハイブリダイゼーション法により検出されていた（非特許文献1～5参照）。

【0004】

【非特許文献1】

Methods Enzymol., 212:319-335(1992)

【非特許文献2】

Methods Enzymol., 212:242-262(1992)

【非特許文献3】

EMBO J. 12:1067-1075(1993)

【非特許文献4】

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:6055-6059(1992)

【非特許文献5】

Biochemistry, 36:3151-3158(1997)

【0005】

【発明が解決しようとする課題】

しかしながら、この従来の超らせんDNAの検出法は、ステップが多く煩雑であるとともに、細胞を破壊しないと検出不可能であった。また、抽出したDNAを制限酵素で切断して、ハイブリダイゼーションするため、DNA中のどの部分が超らせん構造をとっているかは、すでに解明されたDNAでなければ不明であり、超らせん構造の解析の妨げとなっていた。

従って、本発明の目的は、より簡便かつ効率よく細胞内の負の超らせんDNAを検出する方法を提供することにある。

【0006】

【課題を解決するための手段】

そこで本発明者は、種々検討した結果、細胞にビオチン化ソラレン類を導入して長波長紫外線を照射した後、その細胞に発色性、蛍光性又は化学発光性の標識アビジン類を反応させ、当該細胞の発色、蛍光又は発光を直接測定したところ、負の超らせんDNAが選択的に発色又は発光し、細胞内の負の超らせんDNAがそのまま可視化できること、さらには全く意外にも、従来法では存在が確認できなかった部分にも負の超らせんDNAが存在することを見出し、本発明を完成了。

【0007】

すなわち、本発明は、ビオチン化ソラレン類を細胞に導入し、当該細胞に長波長紫外線を照射した後、発色性、蛍光性又は化学発光性の標識アビジン類を反応させ、次いで当該細胞の発色、蛍光又は発光を測定することを特徴とする細胞内の負の超らせんDNAの検出法を提供するものである。

また本発明は、ビオチン化ソラレン類を細胞に導入し、当該細胞に長波長紫外線を照射した後、発色性、蛍光性又は化学発光性の標識アビジン類を反応させ、次いで当該細胞の発色、蛍光又は発光を測定することを特徴とする負の超らせんDNA含有細胞の検出法を提供するものである。

【0008】

【発明の実施の形態】

本発明の検出法に用いられる細胞は、真核生物の細胞であればよく、例えばヒト、ラット、マウス等の哺乳類はもとよりショウジョウバエ等の昆虫由来の細胞であってもよい。これらの細胞は、真核生物の組織、体液を利用することができる。ヒトの場合には、がんが疑われる組織、細胞等を用いて検体とすればよい。

【0009】

ビオチン化ソラレン類は、ソラレンと同様に、負の超らせんをもつDNAの塩基対と塩基対の間へ選択的に挟まりこむ性質を有する。長波長紫外線、例えば365nmの光で励起すると、DNAに取り込まれたビオチン化ソラレン類は共有結合によりDNAを架橋（クロスリンク）する。従って、細胞内において、長波長紫外線照射により超らせんDNAに固定化されたビオチン化ソラレン類に発色性

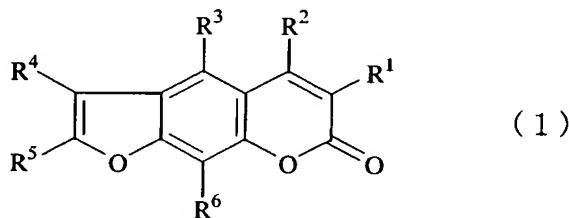
、蛍光性又は化学発光性標識アビジン類を反応させて、当該固定化されたソラレン類部分の発色、蛍光又は発光を測定すれば、細胞内における超らせんDNA部分のみが選択的に検出できる。

【0010】

本発明に用いられるビオチン化ソラレン類としては、ビオチン化された光増感作用を有するソラレン類であればよく、例えば次の一般式（1）

【0011】

【化1】



【0012】

(式中、R¹～R⁶のうちの5個はそれぞれ、水素原子、アルキル基、アルコキシ基、ハロゲノアルキル基、ヒドロキシアルキル基、アミノアルキル基、アルコキシカルボニル基、ハロゲン原子又はアミノ基を示し、残余の1個はビオチン残基又はビオチナー架橋基を示す)

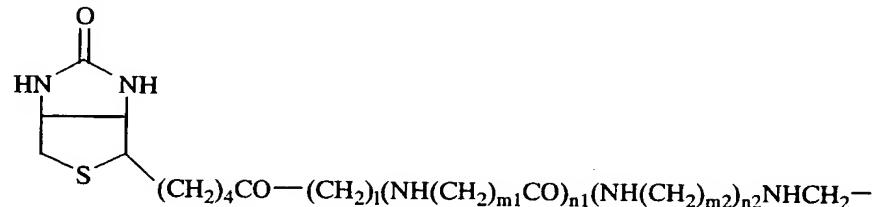
で表されるビオチン化ソラレン類が挙げられる。

【0013】

ここで、ビオチナー架橋基としては、次式（2）

【0014】

【化2】



【0015】

(式中、 l は0～4の数を示し、 m^1 及び m^2 は1～8の数を示し、 n^1 及び n^2 は0又は1の数を示す)

で表される基が好ましい。また、前記アルキル基、アルコキシ基、ハロゲノアルキル基、ヒドロキシアルキル基、アミノアルキル基、アルコキシカルボニル基におけるアルキル又はアルコキシ部分の炭素数は1～4が好ましく、特に1が好ましい。 R^1 ～ R^6 におけるビオチン残基又はビオチナー架橋基以外の基としては水素原子、メチル基又はメトキシ基が特に好ましい。

【0016】

特に好ましいビオチン化ソラレン類としては、4'－ビオチニアミドペンチルアミドヘキシリアミノメチル－4，5'，8－トリメチルソラレン等が挙げられる。これらのビオチン化ソラレン類はAmbion社によって市販されているものを用いることもできる。

【0017】

ビオチン化ソラレン類を細胞内に導入するには、細胞含有液にビオチン化ソラレン類を添加すればよいが、細胞への導入効率を向上させるためには、細胞膜透過性促進剤の存在下に行うのが好ましい。当該細胞膜透過性促進剤としては、ジギトニン、NP-40, Triton X-100, Tween-20等が挙げられるが、ジギトニンが特に好ましい。ここで、ビオチン化ソラレン類の濃度は、細胞数にもよるが、0.01～100ng/ml、特に0.05～50ng/mlが好ましい。また、ジギトニン濃度は0.001～0.5%、特に0.01～0.05%が好ましい。

【0018】

ビオチン化ソラレン類の励起に用いる長波長紫外線としては、紫外部の長波長領域(320～400nm)であればよいが、340～380nm、特に365nm付近が好ましい。

【0019】

紫外線照射により負の超らせんDNAに固定化されたビオチン化ソラレン類に反応させる発色性、蛍光性又は化学発光性の標識アビジン類としては、ストレプトアビジン、アビジンが挙げられるが、ストレプトアビジンが好ましい。

【0020】

発色性標識体としては、酵素標識が挙げられる。酵素としては、ペルオキシダーゼ、アルカリフォスファターゼが挙げられる。これらの酵素標識アビジン類を用いた場合には、さらに、3, 3'-ジアミノベンジジン（DAB）、5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリルリン酸（BCIP）、3, 3'-(3, 3'-ジメトキシ-4, 4'-ビフェニレン)ビス[2-(4-ニトロフェニル)-5-フェニル-2H-テトラゾリウム クロライド]（NBT）等の発色剤を組み合せることにより発色させることができる。これらの発色性標識体を用いた場合には染色体上でソラレンによってクロスリンクされた部位を茶色又は紫色の色素の沈着として検出することができる。

【0021】

蛍光標識体としては、フルオレセインイソチオシアナート、Alexa Fluor 350、同430、同488、同532、同546、同568、同594、同633、同660、同688、Cy2、Cy3、Cy5、ローダミン等が挙げられる。これらの蛍光標識アビジン類を用いた場合には、蛍光顕微鏡により観察でき、かつ容易に画像化できるので特に好ましい。

【0022】

化学発光標識体としては、ルミノール（5-アミノ-2, 3-ジヒドロ-1, 4-フタラジンジオン）、ルシゲニン（ビス-N-メイチルアクリジニウム ナイトレート）、アクリジニウム エステル、アダマンチル1, 2-ジオキセタンアリル リン酸、ナイトリック オキサイド、ビス(2, 4, 6-トリクロロフェニル)オキサレート等が挙げられる。これらの化学発光標識アビジン類を用いた場合には、X線フィルム上にシグナルを直接記録することが可能である。

【0023】

かくして発色、蛍光又は化学発光を測定すれば、細胞からDNAを抽出する操作をすることなく、ゲノムのどの領域に負の超らせんDNAが存在するかを検出できる。また、負の超らせんDNAを有する細胞を検出することもできる。

【0024】

【実施例】

次に実施例を挙げて本発明をさらに詳細に説明するが、本発明は何らこれに限定されるものではない。

【0025】

A. 材料と方法

(1) 試薬

ビオチン化ソラレンは、Ambionから購入したBrightstarTMPsoralen-Biotin（式（1）中、R¹=R³=H、R²=R⁵=R⁶=CH₃、R⁴=ビオチン-NH(CH₂)₅CONH-(CH₂)₆NHCH₂-である化合物）を用いた。ジギトニンはCalbiochemから購入したもの用いた。 α -アマニチン、BrUTP（ブロモウリジン 5'-トリホスフェート）、4, 5', 8-トリメチルソラレンはSIGMAから購入した。制限酵素は宝酒造から購入した。

【0026】

(1) 热ショック及びX線照射

キイロショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster* Oregon R) は18℃で飼育した。必要に応じて3令幼虫をポリプロピレンチューブに入れて37℃水浴に10分間沈めて熱ショック処理した。唾腺は解剖バッファー（10mM HEPES-KOH pH 7.6、5mM MgCl₂、5mM KCl、130mM NaCl、1%のポリエチレングリコール6000）の中で幼虫を解剖し、得た。必要に応じて、約3Gy/min (TORREX CABINET X-RAY SYSTEMモデルTRX2800、Faxitron) の線量率で60分間唾腺をX線照射してDNAにニック (nick) を導入した。

【0027】

(2) 唾腺染色体の染色

4-5対の唾腺を0.01%のジギトニンを含む解剖バッファー40μlで処理し、次に、ジギトニンを含まない解剖バッファーでリノンスした。続けて0.2ng/mlのビオチン化ソラレンを含む解剖バッファーで10分間処理した。その後、唾腺を長波長(365nm)UVランプ(UVPモデルUVL-21)で照射し、ビオチン化ソラレンをクロスリンクした。また、2mM BrUTPをジギトニン処理と同時に解剖バッファーに加え、伸長途上のmRNAを標識した。ジギトニン処理中に解剖バッファーに3μg/mlの α -アマニチンを添加し、RNAポリメ

ラーゼIIによる転写を阻害した。クロスリンクの後、唾腺を40%の酢酸で固定し、スライドグラス上に唾腺染色体を展開した。BrUTPは、抗BrdU単クローネ抗体 (Roche) 及びローダミン標識抗マウスIgG抗体で検出した。

【0028】

ビオチン化ソラレンは、Alexa488標識ストレプトアビシン (Molecular probe) で検出した。DNAはDAPIにより染色した。蛍光画像は、カール・ツァイスAxioplan2顕微鏡及びIP Labソフトウェアで解析した。

【0029】

(3) サザン法によるクロスリンクの解析

幼虫の熱ショックと解剖は染色の場合と同様に行った。20対の唾腺をソラレンを含んでいる解剖バッファー中に10分間入れた後、365nmの光線により、クロスリンクを行った。クロスリンクされたDNAは、溶解バッファー (10mM Tris-HCl pH8.2、100mM EDTA、0.5%のSDS) 中で55℃、4時間プロテイナーゼK処理した後、フェノール／クロロホルム及びクロロホルム抽出により精製した。精製されたDNAは、制限酵素処理後、さらに精製した後、グリオキサール変性バッファー (1M グリオキサール、10mMリン酸ナトリウムpH7.0、50%ジメチルスルホキシド) に溶解し、50℃、1時間加熱することにより変性した。グリオキサールにより変性したDNAを10mMリン酸ナトリウムバッファー (pH7.0) 中の1%のアガロース・ゲル電気泳動によってクロスリンクされたDNAとされていないDNAに分画した。電気泳動は3.6ボルト/cmで100分間行った。

【0030】

電気泳動後、ゲルを変性液 (0.5M NaOH、1.5M NaCl) 中で65℃、10分間処理してソラレンによるDNAクロスリンクを解除した。ゲル内のDNAをナイロン膜 (HybondN、Amersham) にプロットした。ランダムプライム法により³²P標識したプローブを作製し、ハイブリダイゼーションに使用した。ハイブリダイゼーションのシグナルはX線フィルムにより検出した。プローブの鋳型としてプラスミドp56H8RIA (26) からhsp70 CR及びDDS領域を

切り出した。

【0031】

B. 結果

(1) J u p e 等はシュナイダー細胞を用いてショウジョウバエゲノムの特定の領域についてソラレンのクロスリンクを定量する手法を開発した(非特許文献4)。唾腺染色体で負の超らせんを検出するため、我々はまず、J u p e 等の手法が唾腺のような組織に適用可能であるかどうか、確認した。

手短かに手法を述べると、熱ショック前、後の幼虫から唾腺を取り出し、様々な濃度のソラレンを含むバッファーに浸漬した後、365 nmの光線を照射してクロスリンクを行った。DNAを精製した後、制限酵素処理を行い、グリオキサーにより変性させた。クロスリンクされたDNAとされていないDNAをゲル電気泳動により分画し、ゲルを65°Cでアルカリ処理した後、ナイロン膜にDNAをプロットした。87A7に位置するhsp70(図1、CR及びDDS)をプローブとしてサザン法により解析した。高温でのゲルのアルカリ処理はクロスリンクされたDNAの検出に不可欠であり、この処理によりゲル内でのクロスリンクされたDNAの自己アニーリングを防止し、シグナルを再現性良く検出できるようになった。我々はhsp70コード領域のクロスリンクのソラレンに対する濃度依存性を確認した(図2)。幼虫を熱ショックすることにより、クロスリンクの頻度は上昇した(図2)。熱ショック後の幼虫から得た唾腺をX線照射処理し、DNAにニックを導入してからソラレンによるクロスリンクを試みた結果、クロスリンクされたDNAはほとんど検出されなかった(図3(レーン3、レーン4))。対照として、ソラレンによるクロスリンクを行った後にX線を照射しても結果に変化は見られなかった(図3(レーン5、レーン2))。X線の照射量はおよそ30 kbに一箇所のニックをDNAに導入すると予想されるので、X線照射により超らせんが弛緩されている領域はCR領域(2 kb)よりも大きいと考えられる。同様の結果は熱ショックをかけていない幼虫から得られた唾腺染色体についても得られた。対照的に、クロスリンクのレベルはhsp70の下流の領域(DDS)で低く、熱ショックによってもクロスリンクの頻度の変化は無かつた(図3(レーン8、レーン9))。

【0032】

これらの結果はシュナイダー細胞を使用して得られていた結果(非特許文献4)と一致し、hsp70領域における負の超らせんの蓄積とその熱ショックによる増加を示すものである。これらの結果より、我々はソラレンのクロスリンクによる解析は培養細胞だけでなく唾腺組織にも適用できると結論付けた。

興味深い事には、熱ショック後の染色体であっても、クロスリンク前に α -アマニチン処理を行うとクロスリンクのシグナルはほとんど検出されなかつた(図3(レーン6、レーン7))。この結果はRNAポリメラーゼIIによる転写を阻害した後、負の超らせんの蓄積は速やかに解消されることを示している。

【0033】

(2) 唾腺染色体上での負の超らせん蓄積部位の可視化

我々は唾腺染色体上でゲノム全体にわたって負の超らせんの蓄積部位を可視化することを目的として、ソラレンによるクロスリンクの手法を発展させ、ビオチン化ソラレンを蛍光標識したストレプトアビシンにより検出することを試みた。唾腺を0.01%ジギトニンにより処理した。ジギトニンは唾腺細胞の膜透過性の向上の目的で使用されており、唾腺染色体での転写研究に適している。ジギトニン処理した唾腺をビオチン化ソラレンを含むバッファーに浸漬し、365nmの光線によりクロスリンクし、酢酸固定した後、スライドガラス上に染色体を展開した。ビオチン化ソラレンはAlexa488標識したストレプトアビシンにより検出した。唾腺染色体上で、多くのシグナルがバンド状に検出された(図4A)。ゲノム全体のうち、約150箇所でシグナルが検出された。これらのシグナルは、ソラレンを含まないバッファーで処理した染色体及びソラレン処理後クロスリンクの操作を行っていない染色体では検出されなかつた。DAPIの像と比較したところ、ソラレンのシグナルはDAPIの蛍光が弱くなる中間帯やパフとほぼ一致した(例えば図4B及び図4Cの中の矢)。一方、ソラレンのシグナルの弱い部分はDAPIのシグナルと一致した(図4B及び図4C)。一部のパフでは、ソラレンのシグナルはパフの両端の部分でのみ観察された(例えば図4B及び図4Cの中の矢頭)。ビオチン化ソラレンでクロスリンク処理する前に180GyのX線照射によりDNAにニックを導入した染色体では中間帯やパフにお

けるソラレンのシグナルは消失した（図5（A～C））。 α -アマニチン処理した染色体でも同様にソラレンのシグナルは消失した（図5 D、E）。対照として、X線照射や α -アマニチン無しで同様の処理を行った染色体では図4に示した結果と同様の像が見られた。これらの結果は、間期のゲノムに転写と共に負の超らせんの蓄積がゲノムの多くの領域で起こっていることを示している。染色体に沿って見られるほんやりとした弱いシグナルは負の超らせんに関係なく非特異的にソラレンがDNAをクロスリンクした結果だと考えられる。

【0034】

（3）熱ショックパフにおける負の超らせんの蓄積

熱ショックパフにおける負の超らせんの蓄積を解析するため、熱ショック処理後の幼虫から解剖して得た唾腺をビオチン化ソラレンでクロスリンクした。熱ショックパフ87Cにおいて強いソラレンのシグナルが観察された（図6（矢87C））。一方、熱ショックパフ87Aでは、パフの両端の部分でシグナルが検出され、中央部分ではシグナルは消失していた（図6（矢87A））。熱ショックパフ93Dにおいてもソラレンのシグナルが検出された（図6（矢93D））。熱ショック後の幼虫から得た唾腺染色体では、熱ショックをかけていない染色体では多数検出された中間帯におけるシグナルはほとんど検出されなくなった。クロスリンク処理前にX線照射（図7（A～C））や α -アマニチン処理（図7（D～F））を行うと、熱ショックパフの形態は保たれているが（図7（矢））、ソラレンのシグナルは消失した。

X線照射により転写がほとんど阻害されていないことは、照射処理後にBrdUTPにより伸長途上のmRNAを標識することにより確認した。このことは、X線照射によるソラレンのシグナルの消失はX線照射による二次的な転写阻害によるものではないことを示している。図6に示したデータと同様の結果はX線照射や α -アマニチン処理の擬似操作を行っても得られた。これらの結果は熱ショックパフにおける転写と共に負の超らせんの蓄積の存在を示している。

【0035】

（4）負の超らせんの蓄積と転写の相関

α -アマニチンに対する感受性から判断すると、中間帯やパフにおける負の超

らせんの蓄積は転写と共に役していると考えられる。これを検証するため、解剖して得た唾腺をクロスリンク処理の直前にBr-UTP処理し、伸長途上の転写産物を標識した。標識されたRNAは多くの中間帯やパフで検出された（図8D, E）。像を重ねると、全てのソラレンのシグナルは伸長途上のRNAが存在するパフや中間帯で強く出ていた（図8F）。

しかし、一部の中間帯やパフでは伸長途上のRNAがはっきりと検出されるにもかかわらず、ソラレンのシグナルはあまり強くなかった（図8F矢）。熱ショック後では、Br-UTPの取り込みは熱ショックパフ87Aと87Cで顕著に見られた。熱ショックパフ93Dにおいても弱いシグナルが検出された（図9）。この結果は、RNAポリメラーゼIIのC-末端リン酸化体が熱ショックパフにのみ局在するという報告（Nature, 370: 75-77(1994)）と一致する。ソラレンの強いシグナルが87Cで検出された一方、87Aの中央領域ではソラレンのシグナルは検出されなかった。転写産物と負の超らせんの分布について詳細に調べるため、87A及び87Cパフの周辺のソラレン、RNA、DNAのシグナル強度を定量した（図9B、9C）。ソラレンとRNAのシグナルの分布は87A及び87Cパフの内部では均一ではないが、よく似たパターンの分布を示した。パフでのDNAのシグナル強度は非常に低かった。定量結果をまとめると、転写と負の超らせんの蓄積ははっきりと関連があることが分かる。負の超らせんは、蓄積と解消の平衡状態にあると考えられる。伸長途上のRNAとソラレンのシグナル強度の比が中間帯やパフによって異なることは、ゲノム上の領域によって平衡状態が一定ではないことを示している。

【0036】

従来法であるサザン法によれば、負の超らせんの蓄積はゲノム上の2箇所について報告されているのみであることから（非特許文献4）、我々はゲノム上で少數の位置にのみソラレンのシグナルが検出されると予想していた。しかし、驚くべきことに、唾腺染色体上で多数のソラレンのシグナルが検出された。シグナルは転写が活性化された状態の多くの中間帯やパフで検出されたが、全てのパフや中間帯にソラレンのシグナルが局在するわけでは無かった。またソラレンのシグナルはクロスリンク前のDNAにニックを導入する処理や転写の阻害を行うこと

により消失した。本発明は間期の染色体上でD N Aの負の超らせんの蓄積を可視化した最初の発明である。これらの結果は、本発明のようにゲノムを直接染色できた本発明によってはじめて得られるものである。

【0037】

【発明の効果】

本発明方法によれば、従来極めて煩雑な操作により、ゲノム上の極く一部の箇所だけしか検出できなかった負の超らせんD N Aが、簡便かつ効率良く検出できる。

【図面の簡単な説明】

【図1】

87A7における遺伝子の位置関係とサザン解析に用いた制限酵素サイトを示す図である。矢は遺伝子の転写方向を示す。87A7はs c s及びs c s' (specialized chromatin structure)に挟まれている。X、XbaI;E、EcoRI;B、BglII。

【図2】

唾腺細胞の87A7のhsp70遺伝子におけるソラレンによるクロスリンクのサザン法解析結果を示す図である。レーン1～7は、熱ショック後の唾腺をソラレン処理有り（レーン2～7）、無し（レーン1）の条件で解析した。クロスリンク処理の前（レーン3）及び後（レーン5）にX線照射を行った。レーン4はX線照射無しで同様の処理を行った。レーン6はソラレン処理の前に α -アマニチン処理を行った。レーン7は α -アマニチン処理を行っていない。

【図3】

ソラレンクロスリンクに対するD N Aニッキング及び転写阻害結果を示す図である。レーン1～7は図2と同じ。レーン8は熱ショック処理を行っていない。レーン9は熱ショック処理を行った。

【図4】

唾腺染色体でのソラレンシグナルの可視化を示す図である。

(A) ビオチン化ソラレンのシグナルをAllexa488標識したストレプトアビジンで検出した（緑）。(B) DAPIのシグナル（青）。(C) 重ねた像。矢は主要な中間帯やパフを示す。いくつかの部位では、中間帯やパフの境界領域

でのみソラレンの強いシグナルが検出された（矢頭）。

【図5】

ソラレンのシグナルがDNAのニッキングや転写阻害により消失することを示す図である。

ビオチン化ソラレンによるクロスリンクの前に、唾腺をX線照射してDNAにニックを導入して超らせんを弛緩した結果（A-C）。また、 α -アマニチンにより転写を阻害した（D-F）。（A-D）ビオチン化ソラレン。（B、E）D API。（C、F）重ねた像。主要な中間帯やパフを矢で示した。

【図6】

熱ショック後の唾腺染色体におけるソラレンの分布を示す図である。

（A）ビオチン化ソラレン。（B）D API。（C）重ねた像。主要な熱ショックパフ87A, 87C, 93Dを矢で示した。矢頭は熱ショック後消失する中間帯におけるソラレンのシグナルを示す。

【図7】

熱ショックパフにおけるDNAのニッキング及び転写阻害によるソラレンのシグナルへの影響を示す図である。

熱ショック後の唾腺をビオチン化ソラレンによるクロスリンク処理前に、X線照射（A-C）もしくは α -アマニチン処理（D-F）した。（A、D）ビオチン化ソラレン。（B、E）D API。（F、C）重ねた像。矢は熱ショックパフ87A及び87Cを示す。

【図8】

唾腺染色体における伸長途上のRNAとソラレンのシグナルの共局在を示す図である。

（A）ビオチン化ソラレン。（B）D API。（C）AとBを重ねた像。（D）Br-UTPで標識した伸長途上のRNA。（E）BとDを重ねた像。（F）AとDを重ねた像。矢は伸長途上のRNAが強く検出されるがソラレンのシグナルが弱い部位を示す。

【図9】

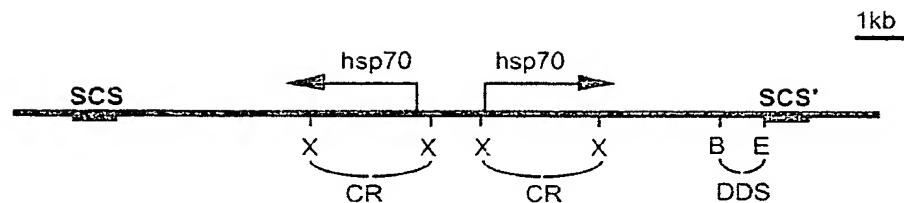
熱ショックパフにおけるソラレンと伸長途上RNAのシグナルの共局在を示す

図である。

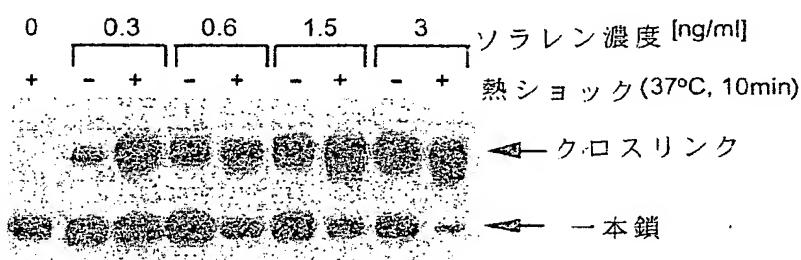
(A) 热ショック後の幼虫から得た唾腺染色体における伸長途上のR N Aとソラレンのシグナルの比較。 (BとD) 87A及び87Cにおける詳細な解析。パネルCはビオチン化ソラレン(緑)、伸長途上のR N A(桃色)、DAPI(青)の(B)に示した領域での蛍光強度を定量した結果である。

【書類名】 図面

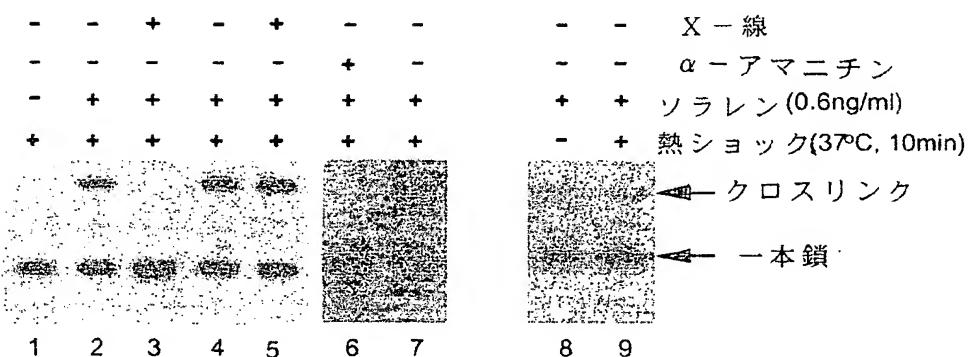
【図 1】



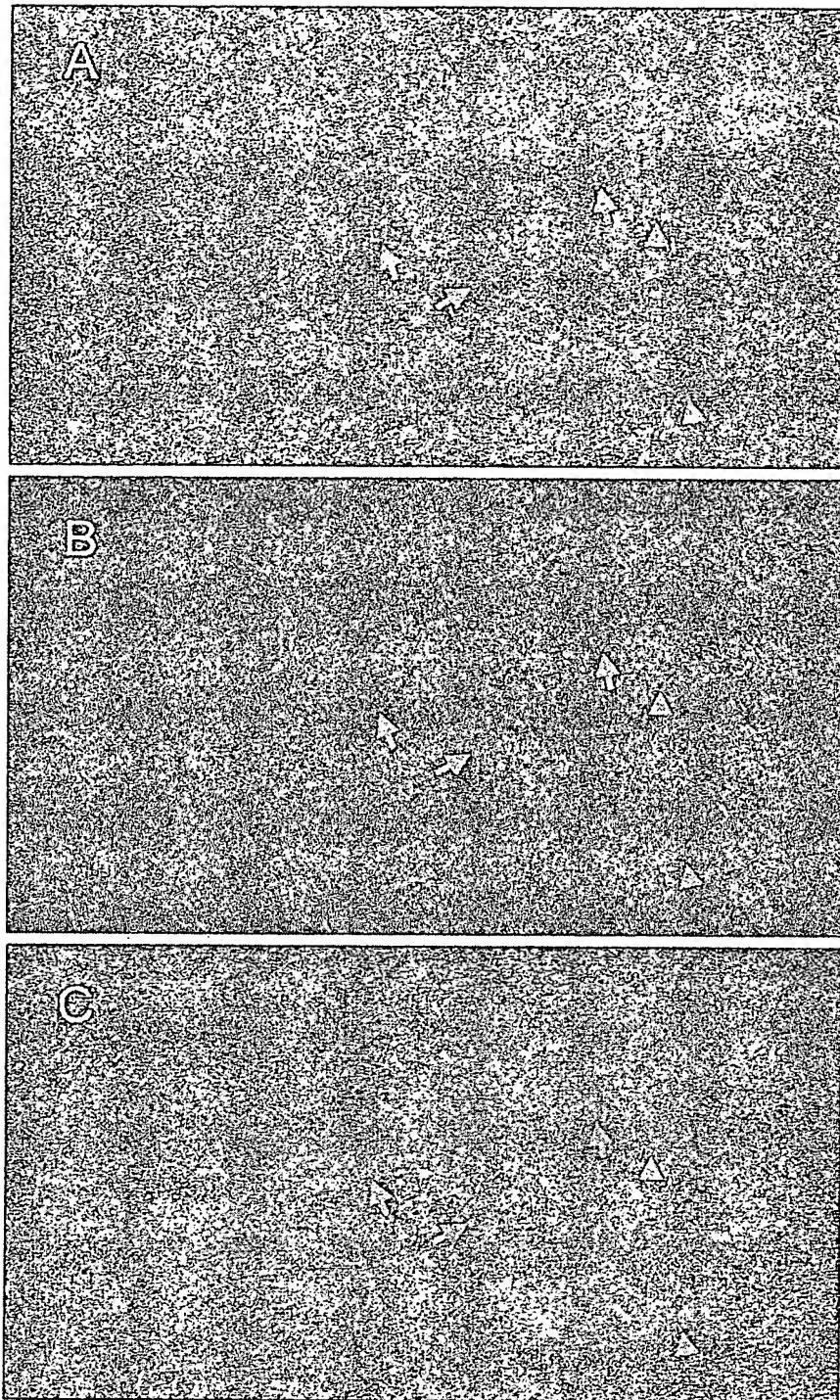
【図 2】



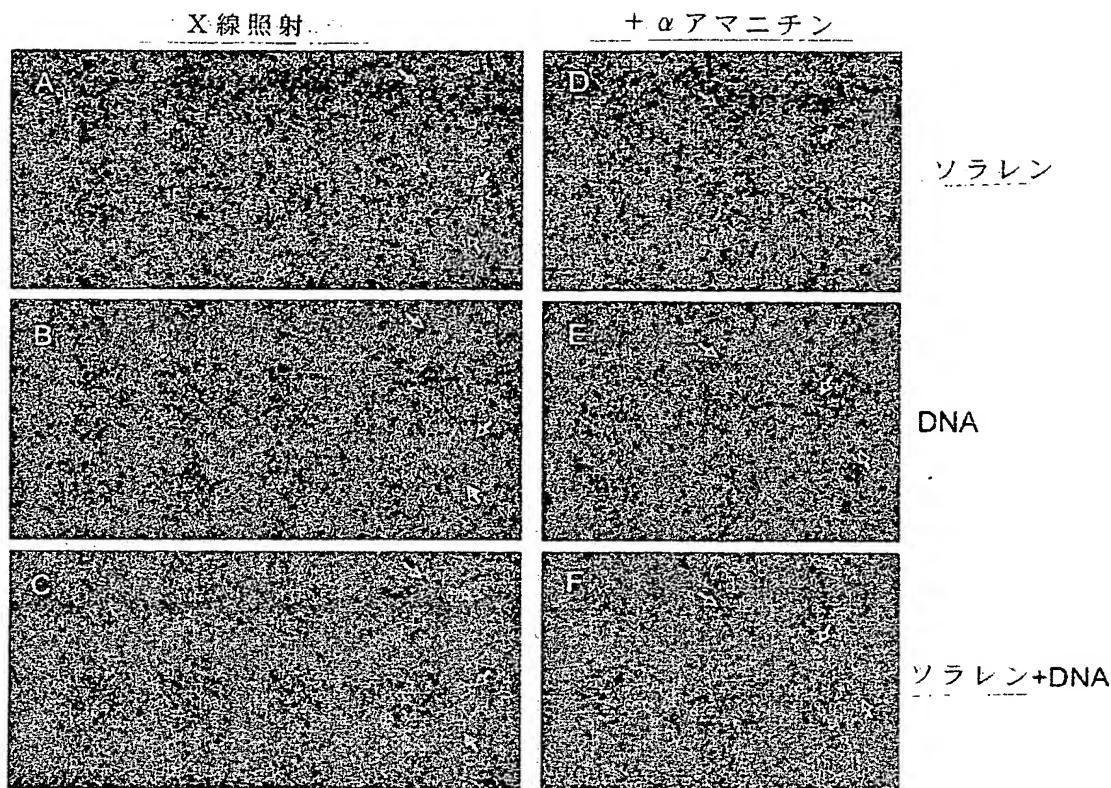
【図 3】



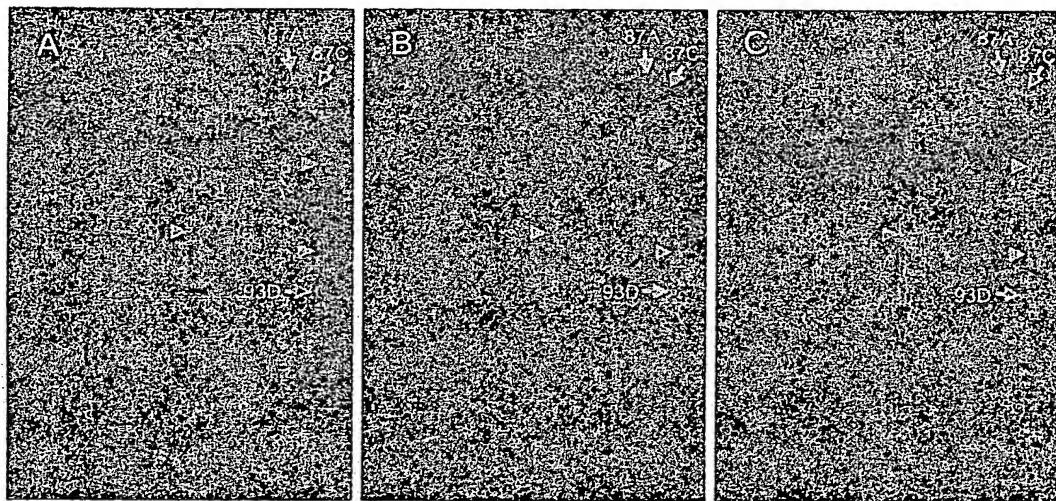
【図4】



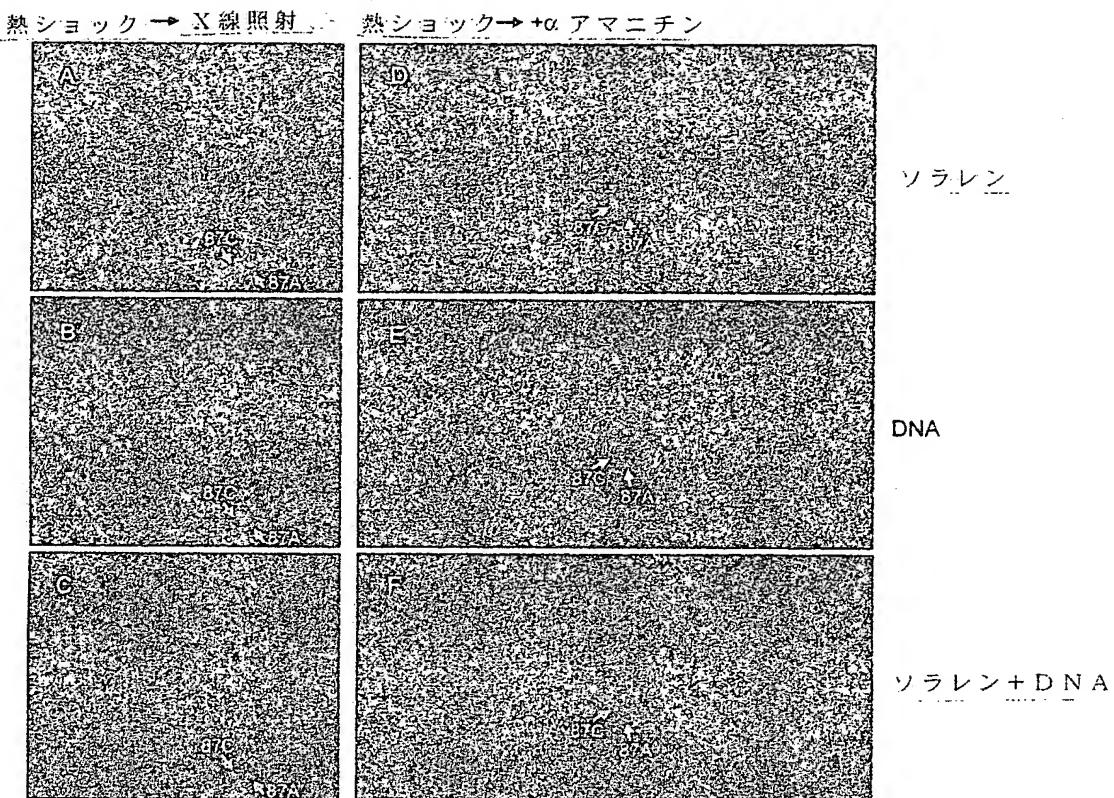
【図5】



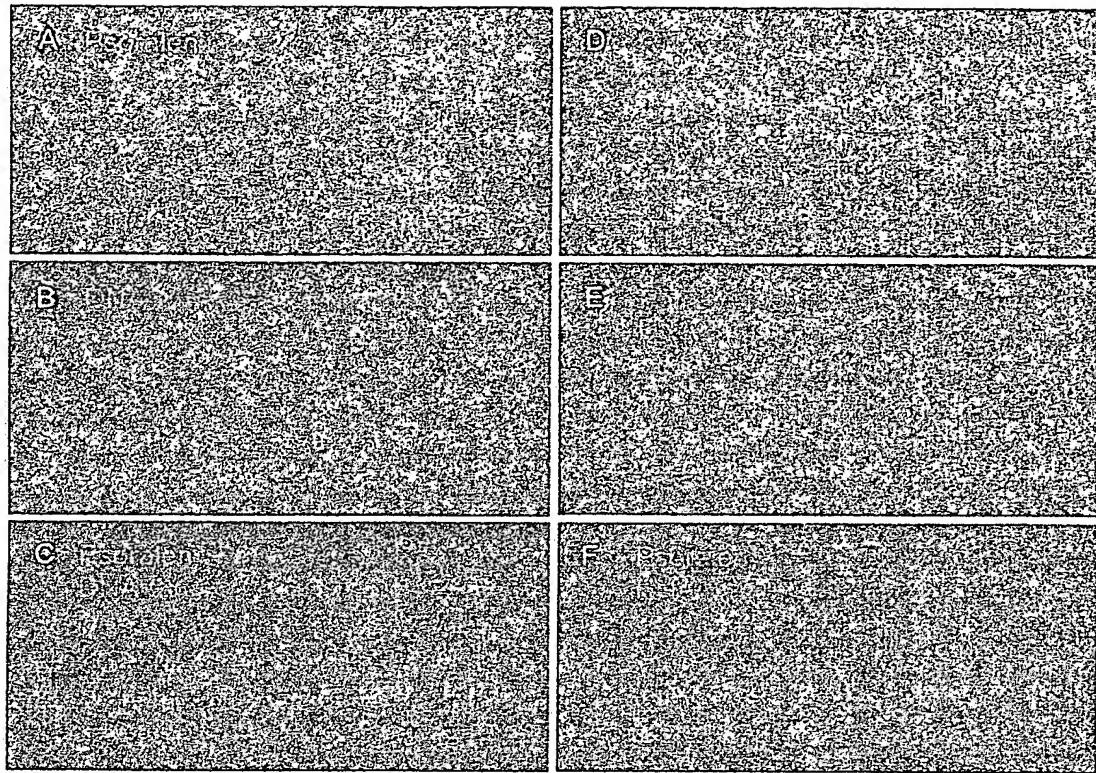
【図6】



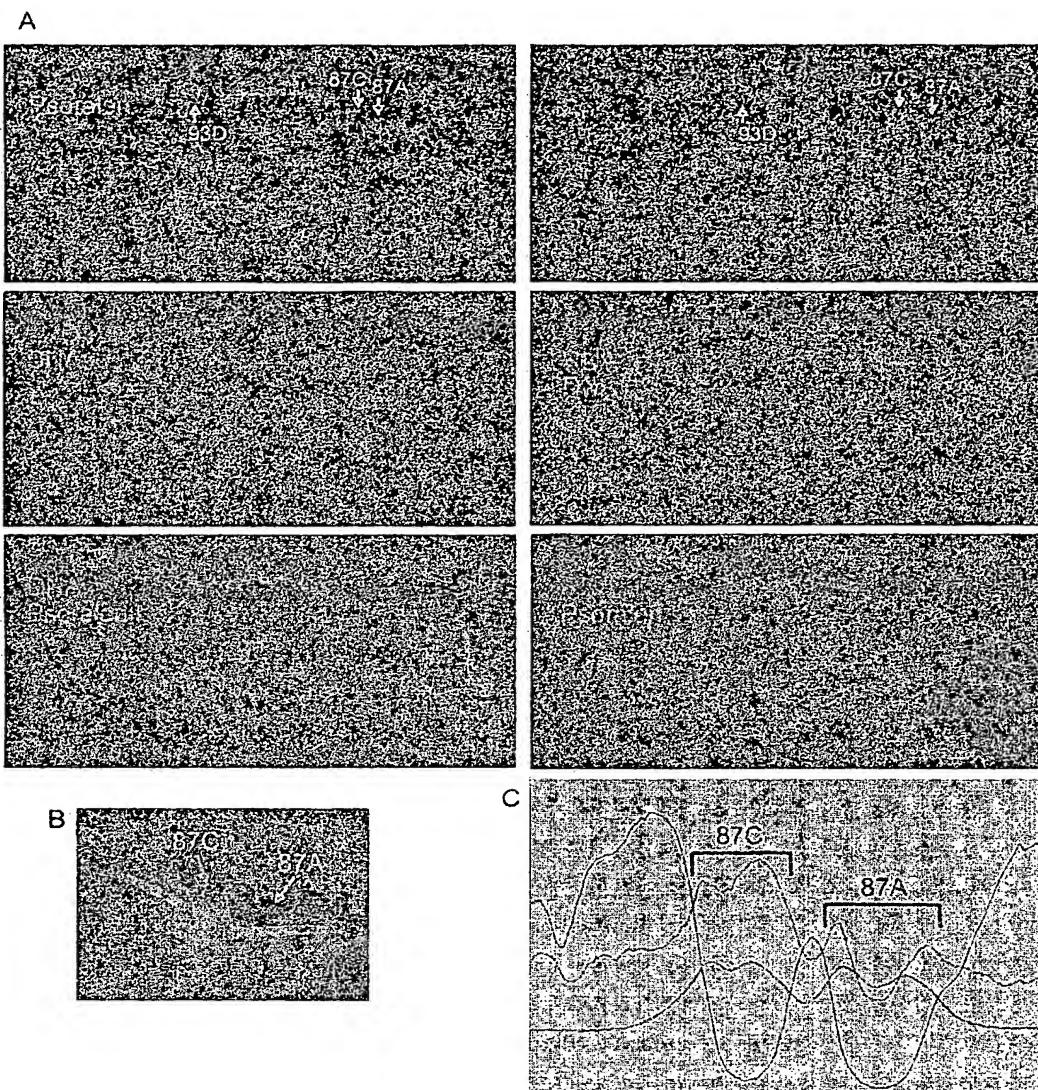
【図 7】



【図8】



【図9】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 細胞内の負の超らせんDNAを簡便かつ効率良く検出する。

【解決手段】 ビオチン化ソラレン類を細胞に導入し、当該細胞に長波長紫外線を照射した後、発色性、蛍光性又は化学発光性の標識アビジン類を反応させ、次いで当該細胞の発色、蛍光又は発光を測定することを特徴とする細胞内の負の超らせんDNAの検出法。

【選択図】 なし

認定・付加情報

特許出願の番号	特願2003-146059
受付番号	50300858790
書類名	特許願
担当官	第六担当上席 0095
作成日	平成15年 7月 3日

<認定情報・付加情報>

【提出日】	平成15年 5月23日
-------	-------------

特願 2003-146059

出願人履歴情報

識別番号 [593206872]

1. 変更年月日 1993年11月12日

[変更理由] 新規登録

住 所 静岡県三島市谷田1111番地
氏 名 国立遺伝学研究所長

【書類名】 新規性の喪失の例外証明書提出書

【提出日】 平成15年5月27日

【あて先】 特許庁長官 殿

【事件の表示】

【出願番号】 特願2003-146059

【提出者】

【識別番号】 593206872

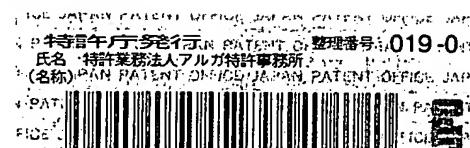
【氏名又は名称】 国立遺伝学研究所長

【代理人】

【識別番号】 110000084

【氏名又は名称】 特許業務法人アルガ特許事務所

【代表者】 中嶋 俊夫



【提出物件の目録】

【物件名】 発明の新規性の喪失の例外の規定の適用を受けるための
証明書 1